

Title	RaLA Activation at Nascent Lamellipodia of Epidermal Growth Factor-stimulated Cos7 Cells and Migrating Madin-Darby Canine Kidney Cells.
Author(s)	高谷, 昭行
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46314">https://hdl.handle.net/11094/46314</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	たか や あき ゆき 高 谷 昭 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20116 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当  医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	RalA Activation at Nascent Lamellipodia of Epidermal Growth Factor-stimulated Cos7 Cells and Migrating Madin-Darby Canine Kidney Cells (EGF 刺激による Cos7 細胞・運動時の MDCK 細胞での葉状仮足における RalA の活性化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松田 道行  (副査) 教 授 高井 義美    教 授 岡田 雅人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

Ral は Ras ファミリー低分子量 G タンパク質の一つで、Ras のシグナル伝達系の下流に存在し、Ras 依存性に活性化される分子である。この分子はエンドサイトーシスやエキソサイトーシスの制御、あるいはフィロポディアの形成に関与することが示されている。また、最近ではヒトにおける Ras を介した細胞癌化や癌細胞の転移に重要な役割を果たしていることも示唆されている。しかしながら、Ral の機能の詳細については多くの点が未だに不明である。そこで、本研究では Ral が時空間的にどのような制御を受けているかを調べ、その情報より Ral の機能や制御機構についての知見を得ることを目的とし、以下の実験を行った。

#### 〔方法ならびに成績〕

初めに、細胞内における Ral 分子の活性化に関する時空間情報を得るため、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) を利用した RalA 分子の活性化モニターの作製を行った。当研究室で作製した Ras の活性化を細胞内で検出するプローブである Raichu-Ras を元にして、Raichu-RalA プローブを構築した。蛍光分光光度計によるアッセイの結果、プローブの FRET 効率は活性型変異体 > 野生型 > 優勢不活性型変異体のようになった。また、Raichu-RalA に結合している GTP/GDP 比は、RalA のそれとほぼ同等であり、活性化因子に対する濃度依存性も FRET 効率とほぼ一致した。Ral に特異的に作用する活性化因子のみがプローブの FRET 効率を上昇させ、他の G タンパク質に作用する活性化因子や不活性化因子では、FRET 効率の変化は確認できなかった。従って、Raichu-RalA は RalA の活性化をモニターできることが確認された。次に、Raichu-RalA を Cos7 細胞に発現させ、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いて、上皮細胞増殖因子 (EGF) 刺激前後での細胞内における RalA 活性化の時間変化を画像化した。Raichu-RalA を発現した Cos7 細胞のイメージングから、EGF 刺激後に生じるラメリポディアにおいて、RalA の活性化が確認された。Ras の活性化はラメリポディアで高い傾向があるものの、必ずしも、ラメリポディアに限定されるわけではないので、RalA は Ras と異なり、ラメリポディアという限定された場で活性化している

ことがわかった。GFPを融合させた Ral の活性化因子を用いることで、Ral の活性化因子がラメリポディアに集っている可能性について調べた。その結果、Ral の活性化因子は EGF 刺激依存性に細胞膜全体への移行が観察された。さらに、優勢不活性型変異体の Rac を導入して、EGF 依存性のラメリポディアの形成を阻害すると、RalA の活性化が阻害された。ラメリポディアの形成を阻害する PI3K の阻害剤やアクチンの重合阻害剤でも同様の結果が得られた。一方で、Ral の標的分子である RalBP1 や Sec5 の Ral 結合部位を細胞内にマイクロインジェクションし、Ral の下流へのシグナルを阻害すると、ラメリポディアの形成が阻害された。次に、MDCK 細胞にプローブを発現させ、wound healing 時の Ral、Ras、Rac、Cdc42 の活性を調べた。Ras 以外は細胞の進行方向に生じるラメリポディアにおいて、活性化が高いことが確認された。また、Ral 結合部位のマイクロインジェクションにより、MDCK 細胞の移動に阻害が見られた。

#### 〔総括〕

FERT を利用することで、RalA の活性化をリアルタイムにモニターするプローブを作製した。このプローブを用いた結果より、Ral は Ras の活性化のパターンと異なり、ラメリポディアという場においてのみ、強く活性化されることがわかった。この空間的制御は Ras から Ral の活性化因子へのシグナル伝達経路のみに依らないことから、Ras からのシグナルに加えて、Ral の活性を空間的に制御する因子の存在が示唆された。また一方で、Ral の活性化には場の形成が必要であると同時にラメリポディアの形成に Ral が関与していることが示唆された。このことから、Ral の活性化には、上流の Ras のシグナルのほかにラメリポディアという場が必要であること、この場には Ral 自身が関与するフィードバックループが存在することが示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

Ral は Ras ファミリー低分子量 G タンパク質の一つで、Ras のシグナル伝達系の下流に存在し、Ras 依存性に活性化される分子である。この分子は現在、細胞癌化や癌細胞の転移に重要な役割を果たしていることも示唆されている。しかしながら、Ral の機能の詳細は、多くの点が未だに不明であり、そこで以下の研究を行った。

初めに、細胞内における Ral 分子の活性化に関する時空間情報を得るため、蛍光共鳴エネルギー移動を利用した RalA 分子の活性化モニター (Raichu-RalA) の作製を行った。次に Raichu-RalA を発現した Cos7 細胞のイメージングから、EGF 刺激後に生じるラメリポディアにおいて、RalA の活性化が確認された。また、Ral の活性化には、上流の Ras のシグナルのほかにラメリポディアという場が必要であること、この場には Ral 自身が関与するフィードバックループが存在することがわかった。これらのシグナルの空間的分布が乱れることが癌化に繋がる可能性を初めて示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられる。